



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Xanthine oxidoreductase-mediated injury is amplified by upregulated AMP deaminase in type 2 diabetic rat hearts under the condition of pressure overload. (2型糖尿病ラットにおいて、キサンチン酸化還元酵素による心機能障害はAMPデアミナーゼ活性亢進により圧負荷下で増幅される)
Author(s) 著者	井垣, 勇祐
Degree number 学位記番号	甲第3138号
Degree name 学位の種別	博士(医学)
Issue Date 学位取得年月日	2021-03-31
Original Article 原著論文	J Mol Cell Cardiol. 2021 May;154:21-31
Doc URL	
DOI	10.1016/j.yjmcc.2021.01.002
Resource Version	Publisher Version

博士論文の要約

氏 名	井垣 勇祐
<p>＜論文題名＞</p> <p>Xanthine oxidoreductase-mediated injury is amplified by upregulated AMP deaminase in type 2 diabetic rat hearts under the condition of pressure overload.</p> <p>(2 型糖尿病ラットにおいて、キサンチン酸化還元酵素による心機能障害は AMP デアミナーゼ活性亢進により圧負荷下で増幅される)</p> <p>＜研究目的＞</p> <p>糖尿病性心筋症は冠動脈疾患と高血圧を伴わない心機能障害と定義され、拡張障害が収縮障害に先行して生じる。安静時に心不全を呈さない患者においても拡張機能障害の存在は心血管死亡率を上昇させると報告されており、その臨床的な重要性は明らかであるが特異的な治療は未だ無い。</p> <p>我々は最近、2 型糖尿病ラット Otsuka Long-Evans-Tokushima fatty rats (OLETF) を用いて、圧負荷で顕在化する拡張機能障害が心筋 AMP デアミナーゼ (AMPD) の活性亢進により惹起されることを報告した。OLETF における AMPD 活性上昇は IMP レベルの上昇、アデニンヌクレオチドプールの減少および ATP の減少と相関すること、および心筋細胞における AMPD3 (ラット心筋の主要なアイソフォーム) の過剰発現が ATP を減少させたことから、AMPD 活性亢進による ATP の減少が拡張機能障害の原因と考えられた。一方、AMPD 活性亢進により増加したプリンヌクレオチド代謝経路の中間体である IMP とイノシンの機能的意義についてはまだ検討がなされていない。</p> <p>本研究では AMPD がキサンチン酸化還元酵素 (XOR) の反応基質の増加および活性の亢進を介して糖尿病性心筋症の心機能障害に寄与するという仮説を立て検証した。この仮説の根拠は (1) XOR はヒポキサンチンからキサンチンを経て尿酸を生成する反応を触媒する際に、副産物として活性酸素種 (ROS) を産生すること、(2) メタ解析研究によって高尿酸血症が心不全患者において死亡の独立した予測因子であることが示されていること、(3) OLETF の心筋 AMPD 活性の亢進は、圧負荷下において XOR の反応基質であるキサンチンの増加と関連すること、(4) 非心筋組織においてではあるものの、糖尿病による XOR の活性亢進が示されていることである。</p> <p>＜研究方法＞</p> <p>[実験 1] XOR 阻害薬であるトピロキソスタット混合餌 (0.5 mg/kg/日) または対照餌を 14 日間与えた 29-35 週齢の OLETF と LETO を用い、麻酔調節呼吸下で右頸動脈から圧測定用</p>	

カテーテルを左室に挿入した。ベースラインおよびフェニレフリン持続静注により血圧を 200 mmHg まで上昇させた圧負荷下において、左室内圧-容積曲線を解析し、左室収縮能および拡張能の指標となるパラメーターを記録した。

[実験 2] 実験 1 のベースラインおよび圧負荷後に摘出した心臓を用いて、(1) AMPD 活性、XOR 活性、ヒポキサンチン、キサンチン、尿酸、ATP の測定、および (2) 酸化ストレスの指標として左室心筋組織 4-HNE 染色陽性域と MDA+4-HNE レベルの定量評価、カルボニル化蛋白レベルの定量評価を行った。

[実験 3] 実験 2 と同様に得た左室心筋組織を用いて XOR 蛋白レベルをウェスタンブロット (WB) 法により定量評価した。また、培養 H9c2 細胞に FLAG 標識 AMPD3、または AMPD3 の発現を負に制御する micro RNA -301b のオリゴヌクレオチド阻害薬 (miR-301b inhibitor) をトランスフェクション後に、XOR 蛋白レベルを WB 法により定量評価した。さらにベースラインで採取した左室心筋ホモジネートを用い、イノシンの添加が XOR 活性に与える影響を検討した。

[実験 4] 実験 3 同様に FLAG 標識 AMPD3 をトランスフェクションした H9c2 細胞で、ヒポキサンチン、ATP、酸化ストレスの指標である DCF 染色の染色強度を定量評価した。

[実験 5] OLETF および LETO の左室心筋からミトコンドリアを単離した。ADP、oligomycin、FCCP、rotenone+antimycin A 添加前後の酸素消費速度を細胞外フラックスアナライザーを用いて測定しミトコンドリアの state 3、state 4 および最大呼吸を定量評価した。

<研究成績>

[実験 1] ベースラインにおける圧-容積曲線では、左室拡張能の指標である弛緩時定数 Tau と左室拡張末期圧 (LVEDP)、左室収縮能の指標である左室収縮末期エラストランス (Ees)、左室圧最大変化率 (dP/dtmax)、実効動脈エラストランス (Ea) および左室-動脈カップリングの指標である Ea/Ees は OLETF と LETO で同等であった。圧負荷下では、OLETF および LETO のいずれにおいてもベースラインと比較して Tau は有意に延長、LVEDP は有意に上昇した。圧負荷後は OLETF において LETO よりも、LVEDP は有意に高く Tau は延長する傾向を示した。トピロキソスタットによる治療は圧負荷下では OLETF においてのみ、Tau ($14.7 \pm 0.8 \rightarrow 11.8 \pm 0.8$ msec) と LVEDP ($18.3 \pm 1.5 \rightarrow 11.3 \pm 1.1$ mmHg) の両者を改善した。圧負荷後の Ea/Ees の上昇は、OLETF で有意に高度であり、トピロキソスタットによって OLETF においてのみ抑制された。これらの成績から、XOR は糖尿病性心筋症において圧負荷による拡張機能および左室-動脈カップリングの増悪に関与することが示された。

[実験 2] AMPD および XOR の活性はベースラインおよび圧負荷下のいずれでも OLETF において LETO よりも高かった。一方、ベースラインにおいてヒポキサンチン、キサンチン、尿酸のレベルは OLETF と LETO で同等であった。圧負荷によって AMPD 活性は変化しなかったが、XOR 活性、キサンチンおよび尿酸レベルは OLETF と LETO のいずれにおいても有意に上昇し、その程度は OLETF において、より高度であった。圧負荷下におけるト

トピロキソスタットによる治療は、AMPD 活性には影響を与えずに XOR 活性を抑制し、OLETF における心筋 ATP レベルの低下を回復させた。またキサンチンおよび尿酸レベルは OLETF および LETO のいずれにおいてもトピロキソスタットによって低下した。左室心筋組織において脂質過酸化の指標である 4-HNE 陽性染色域と MDA+4-HNE レベル、およびカルボニル化蛋白レベルは OLETF において LETO よりも有意に高く、トピロキソスタットはいずれの酸化ストレスの指標も軽減させた。

[実験 3] 心筋の XOR 蛋白発現レベルはトピロキソスタットによる治療の有無にかかわらず OLETF において LETO と比較して 16%高かったが、OLETF における XOR 活性上昇の程度と比較すると蛋白発現レベルの上昇は相対的に低かった。一方、H9c2 細胞において、FLAG 標識 AMPD3 の過剰発現や、miR-301b inhibitor のトランスフェクションは XOR 蛋白発現レベルを上昇させなかった。OLETF および LETO の左室心筋ホモジネートにイノシン (300 μ M) を添加したところ XOR 活性が有意に上昇した。

[実験 4] H9c2 細胞において FLAG 標識 AMPD3 をトランスフェクションすると、対照ベクターのトランスフェクションと比較して、ヒポキサンチンおよび DCF 染色で評価した酸化ストレスレベルが有意に上昇し、ATP レベルが有意に低下した。これらの成績から、OLETF 心筋における AMPD 活性亢進は、酸化ストレスの上昇および ATP レベル低下の原因であることが示された。

[実験 5] ADP 非存在下の state 4 呼吸は OLETF または LETO から単離されたミトコンドリアの間で差を認めなかった。一方、ADP 存在下の state 3 呼吸およびミトコンドリア脱共役剤である FCCP 存在下での最大呼吸は OLETF において LETO と比較して有意に低下していた。トピロキソスタットによる治療は OLETF において state3 呼吸、最大呼吸のいずれをも有意に回復させた。

<考察>

本研究では、XOR 活性が AMPD の反応産物であるイノシンによって亢進されていることから、糖尿病性心筋症の病態において AMPD と XOR が機能的に関連することが示された。また、トピロキソスタットが OLETF 心筋組織の酸化ストレスレベルを有意に減少させミトコンドリア呼吸能を改善したため、XOR による ROS 産生が糖尿病性心筋症においてミトコンドリア機能障害に寄与すると考えられる。圧負荷下では、AMPD の反応基質である AMP レベルが上昇し AMPD によるイノシン産生が増加することから予測されるように、心筋 XOR 活性はさらに上昇した。圧負荷が XOR 活性へ与える影響は糖尿病において非糖尿病よりも有意に大きかった。トピロキソスタットによる XOR 阻害は AMPD 活性が亢進している OLETF においてはミトコンドリア機能障害、心筋 ATP レベル低下および左室拡張機能障害を改善したが、このような効果は LETO では観察されなかった。これらの成績は、AMPD 活性亢進は XOR の活性上昇と反応基質の増加による ROS 産生を増加させること、そして左室仕事量が増加した条件下では ROS によるミトコンドリア機能障害が左室機

能障害を増悪させることを示唆する。

本研究では OLETF における AMPD 活性の亢進がイノシンレベルの上昇を介して間接的に XOR 活性亢進に寄与していることが示された。一方、H9c2 細胞における AMPD3 の過剰発現が XOR 蛋白の発現レベルに影響を与えなかったことから AMPD 活性が XOR 蛋白発現を制御する可能性は否定される。以前我々は OLETF 心筋における miR-301b の発現低下が AMPD3 の発現亢進の原因であることを報告したが、H9c2 細胞において miR-301b inhibitor は XOR 蛋白発現に影響を与えず、miR-301b が AMPD3 と同時に XOR の翻訳制御に寄与する可能性も否定された。一方、糖尿病性心筋症では TNF- α が共通の転写機構の活性化により AMPD3 と XOR の発現増加に寄与する可能性を示唆する報告がある。すなわち、TNF- α の mRNA と蛋白レベルは糖尿病モデルである db/db マウスで野生型マウスと比較して有意に上昇していることや、腎上皮細胞において TNF- α が XOR mRNA のレベルを上昇させること、さらに肺組織において虚血再灌流後の AMPD mRNA レベルは TNF- α 蛋白レベルと相関することが報告されている。

Fujii らは XOR 阻害薬であるフェブキソスタットがマウス腎虚血再灌流障害後の ATP レベルの回復を促進し組織障害を抑制することを報告した。フェブキソスタットの効果は hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)-1 の発現を抑制することにより消失したことから、プリンサルベージ経路の活性亢進がその腎保護作用に寄与することが示された。本研究においては、HPRT 活性は OLETF における拡張機能障害の重症度やトピロキソスタットによる保護効果と相関せず、糖尿病による圧負荷下の左室心機能障害においてはプリンサルベージ経路は XOR 阻害による保護効果の主要な機序ではないと考えられた。

EXACT-HF 試験では高尿酸血症を伴う心不全患者の予後に対する XOR 阻害薬の効果が検討された。尿酸レベル上昇と心不全重症度の相関を示した観察研究の結果に基づく仮説に反し、XOR 阻害薬のアロプリノールは心血管イベントを抑制しなかったが、この成績は一部の心不全患者における XOR の左室機能障害への寄与を否定するものではない。高尿酸血症には尿酸産生亢進だけではなく尿酸排泄低下も関与し得ることや、尿酸が細胞外での ROS 除去に寄与することを考慮すると、尿酸レベルは XOR による心筋障害のハイリスク患者を同定する優れたバイオマーカーとはいえない。本研究では、糖尿病心において圧負荷下の左室仕事量増加により XOR 活性が上昇することが示され、2 型糖尿病を伴う心不全患者では、XOR 阻害薬の有効性が期待できる可能性が示唆される。

<結論>

2 型糖尿病心筋では圧負荷下において XOR による ROS 産生が増加しており、ミトコンドリア呼吸鎖障害および左室機能障害が惹起される。糖尿病心筋における AMPD 活性亢進は XOR の反応基質の増加とイノシトルレベル上昇による活性亢進の両者を介して XOR による ROS 産生の増加に寄与する。